

-1 APR 2003

2

SELESAI



PAMERAN

LAPORAN PENELITIAN  
DIK SUPLEMEN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
TAHUN ANGGARAN 2001

## PENGARUH BERBAGAI TINGKAT ULTRA SONIKASI TERHADAP ANTIGENITAS PROTEIN MEMBRAN KUMAN *S.pullorum*

Peneliti:

drh. SUSILOHADI WIDJAJANTO, MS.  
drh. SUWARNO, M.Kes

### LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Dana DIK Suplemen Universitas Airlangga Tahun 2001

S.K Rektor Universitas Airlangga Nomor 5306/J03/PG/2001

Tanggal 12 Juni 2001

Nomor Urut: 22

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Desember, 2001



1. BACTERIAL DISEASES IN POULTRY

IR - Perpustakaan Universitas Airlangga

2. BACTERIAL DISEASES - VACCINATION

KKC

KK

636.089 692

Wid.

P.



LAPORAN PENELITIAN  
DIK SUPLEMEN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
TAHUN ANGGARAN 2001

## PENGARUH BERBAGAI TINGKAT ULTRA SONIKASI TERHADAP ANTIGENITAS PROTEIN MEMBRAN KUMAN *S.pullorum*

Peneliti:

drh. SUSILOHADI WIDJAJANTO, MS.

drh. SUWARNO, M.Kes

3000 204023141



**LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai oleh Dana DIK Suplemen Universitas Airlangga Tahun 2001

S.K Rektor Universitas Airlangga Nomor 5306/J03/PG/2001

Tanggal 12 Juni 2001

Nomor Urut: 22

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Desember, 2001



UNIVERSITAS AIRLANGGA  
JALAN MOJOPAHAD 3  
SURABAYA 60132

PENGARUH BERBAGAI TINGKAT ULTRA SONIKASI TERHADAP  
ANTIGENITAS PROTEIN MEMBRAN KUMAN *S. pullorum*

Disusun oleh:  
Susilohadi Widjanto

Surabaya, 2019





## LEMBAGA PENELITIAN

- |  |                                       |  |
|--|---------------------------------------|--|
| 1. Puslit Pembangunan Regional         | 5. Puslit Pengembangan Gizi (5995720) | 9. Puslit Kependudukan dan Pembangunan (5995719) |
| 2. Puslit Obat Tradisional             | 6. Puslit/Studi Wanita (5995722)      | 10. Puslit/ Kesehatan Reproduksi                 |
| 3. Puslit Pengembangan Hukum (5923584) | 7. Puslit Olah Raga                   |  |
| 4. Puslit Lingkungan Hidup (5995718)   | 8. Puslit Bioenergi                   |  |

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5995246  
E-mail : lpunair@rad.net.id - http://www.geocities.com/Athens/Olympus/6223

**IDENTITAS DAN PENGESAHAN  
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN**

- |  |   |   |
|--|---|---|
| <b>1. Judul Penelitian</b>               | : | Pengaruh Berbagai Tingkat Ultra Sonikasi Terhadap Antigenitas Protein Membran Kuman Salmonella pullorum                         |
| a. Macam Penelitian                      | : | <input type="checkbox"/> Fundamental <input type="checkbox"/> Terapan <input checked="" type="checkbox"/> Pengembangan          |
| b. Kategori Penelitian                   | : | <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input checked="" type="checkbox"/> III                                  |
| <b>2. Kepala Poyek Penelitian</b>        |   |   |
| a. Nama lengkap dan Gelar                | : | Drh. Susilohadi Widjajanto. MS.   |
| b. Jenis kelamin                         | : | Laki-Laki   |
| c. Pangkat/Golongan dan NIP              | : | Pembina/Va/130 687 552  |
| d. Jabatan Sekarang                      | : | Staf Pengajar   |
| e. Fakultas/Puslit/Jurusan               | : | Fakultas Kedokteran Hewan   |
| f. Univ/Ins./Akademi                     | : | Universitas Airlangga   |
| g. Bidang Ilmu yang diteliti             | : | Bakteriologi Molekuler dan Imunologi  |
| <b>3. Jumlah Tim Peneliti</b>            | : | 2 (dua) orang   |
| <b>4. Lokasi Penelitian</b>              | : | Fakultas Kedokteran Hewan Unair   |
| <b>5. Kerjasama dengan Instansi lain</b> |   |   |
| a. Nama Instansi                         | : | -   |
| b. Alamat                                | : | -   |
| <b>6. Jangka waktu penelitian</b>        | : | 5 (lima) bulan  |
| <b>7. Biaya yang diperlukan</b>          | : | Rp. 3.500.000,00  |
| <b>8. Seminar Hasil Penelitian</b>       |   |   |
| a. Dilaksanakan Tanggal                  | : | 30 Nopember 2001  |
| b. Hasil Penelitian                      | : | ( ) Baik Sekali                      ( ) Baik<br>( <input checked="" type="checkbox"/> ) Sedang                      ( ) Kurang |

Surabaya, 10 Desember 2001



Mengetahui/Mengesahkan  
a.n. Rektor  
Ketua Lembaga Penelitian.

Prof. Dr. H. Sarmanu, M.S. *p*  
NIP 130701125





## KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan puji syukur kehadapan Allah swt, karena hanya ijin, berkah, taufik, hidayah dan ridhoNya maka akhirnya dapat terselesaikan penulisan Laporan Hasil Penelitian yang berjudul “ **PENGARUH BERBAGAI TINGKAT ULTRA SONIKASI TERHADAP ANTIGENITAS PROTEIN MEMBRAN *Salmonella pullorum*** “.

Penelitian ini dilakukan sebagai peran dan aktifitas serta bentuk dari Tri Dharma Perguruan Tinggi khususnya bidang Penelitian yang merupakan Dharma kedua. Penelitian diajukan melalui Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.

Pada kesempatan yang baik ini penulis menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar – besarnya kepada Prof,dr.H.Soedarto,DTM&H, Ph. D. selaku Rektor Universitas Airlangga, Prof.Dr. H. Sarmanu., Drh. MS., selaku Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga dan Dr. Ismudiono, drh,MS. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, yang telah memberikan kesempatan dan bantuan serta fasilitas sehingga penelitian dapat berlangsung dengan baik.

Semoga hasil penelitian ini dapat memberikan informasi dalam khasanah ilmu pengetahuan terutama bidang bakteriologi veteriner dan sidang pembaca sekalian, penyusun maupun juga kepada peminat lainnya. Amien.

Surabaya, Nopember 2001

Penyusun

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran Analisa Data.....	23



## ABSTRAK

PENGARUH BERBAGAI TINGKAT ULTRA SONIKASI TERHADAP  
ANTIGENITAS PROTEIN MEMBRAN KUMAN *S.pullorum*\*  
Susilohadi Widjajanto\*\*, Suwarno\*\*\*

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah protein membran luar (OMP) kuman *S.pullorum* dapat diisolasi dan apakah dengan perlakuan berbagai tingkat ultra sonikasi berpengaruh terhadap daya antigenik protein OMP tersebut.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa protein OMP dapat diisolasi dan dengan cara Elisa dapat diketahui daya antigeniknya pada masing – masing tingkat perlakuan ultra sonikasi. Perbandingan antara nilai OD sampel dengan kontrol negatif antara 2 – 3 kali, sehingga diketahui bahwa masing – masing perlakuan bersifat antigenik sama. Hal ini terlihat dari analisa data dengan T – tes pada masing – masing hari tersebut bahwa t hitung lebih kecil dari t tabel dengan P lebih besar dari 0,05.

Dapat ditarik kesimpulan bahwa protein OMP kuman *S.pullorum* dapat di isolasi dengan cara ultra sonikasi dan dengan perlakuan berbagai tingkat sonikasi daya antigeniknya sama. Oleh karena itu disarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap sub unit kuman ( sebagai molekuler ) yang dapat dipakai sebagai bahan dasar vaksin.

Kata kunci : Protein OMP *S.pullorum* – Sonikasi bertingkat – Antigenik.

- 
- \* : Lembaga Penelitian Universitas Airlangga Surabaya. Nomer kontrak:  
589/JO3.2/PG/2001.  
\*\* : Jurusan Ilmu Penyakit Hewan dan Kesmavet, Bakteriologi FKH-UNAIR.  
\*\*\* : Bagian Virologi – Immunologi FKH – UNAIR.

## RINGKASAN

### PENGARUH BERBAGAI TINGKAT ULTRA SONIKASI TERHADAP ANTIGENITAS PROTEIN MEMBRAN KUMAN *S.pullorum*. ( Susilohadi.W. dan Suwarno., 2001 )

Penyakit pullorum adalah penyakit bakterial disebabkan oleh kuman *Salmonella pullorum*, apabila menyerang anak ayam umur satu hari sampai tujuh hari penyakitnya bersifat akut dan berakibat fatal sampai sekitar 90%, sedangkan pada ayam dewasa yang terkena akan bersifat khronis dan terjadi penurunan berat badan , produksi telur turun, daya tetas turun dan ayam tertular menjadi sumber penularan ( carier ).

Laporan dari Balai Penyidikan Penyakit Hewan menunjukkan bahwa kejadian Penyakit Pullorum masih belum diberantas, seperti misalnya kasus penyakit pullorum yang positif di Kendal ( 16 ), Bantul ( 5 ), Tuban ( 64 ) dan Jakarta ( 2 ). Selain itu juga pada daerah Sumatra Utara ( Deli Serdang ), Lampung ( 57 ) , Bengkulu ( 96 ), Sumatra Selatan, Bolaang Mangondow, Kotamobagu, Sulawesi Utara ( 1 ), Sulawesi Tengah ( 3 ) dan Sulawesi Selatan ( 92 ).

Upaya pemerintah untuk mencegah penyakit adalah melaksanakan Peraturan Direktur Jenderal Peternakan dengan melakukan Pullorum Test cara Rapid Whole Blood Test ( RWBT, dilakukan di lapangan ) atau dengan Rapid Serum Test ( RST, dilakukan di laboratorium). Pengobatan terhadap penyakit dengan menggunakan antibiotika belum memuaskan hasilnya. Sedangkan pencegahan dengan pemberian vaksin belum pernah dilakukan di Indonesia. Oleh karena itu pencegahan yang dilakukan kecuali pullorum tes juga dengan hygiene dan sanitasi kandang yang baik serta pemberian pakan yang berkualitas baik.

Setelah dilakukan penelitian dengan pemberian baterin kepada ayam dara yang ternyata hasilnya kurang memuaskan karena memiliki titer rendah, maka penelitian selanjutnya adalah dengan memanfaatkan sub unit kuman yaitu protein membran luar ( protein OMP ) kuman *Salmonella pullorum* untuk mengetahui sifat daya antigeniknya dengan cara Elisa.

Penelitian ini bertujuan untuk : (1) melakukan isolasi protein membran kuman *S.pullorum*, (2) mengetahui apakah dengan berbagai tingkat sonikasi,

protein OMP tersebut berpengaruh terhadap daya antigenitasnya..

Penelitian ini menggunakan sampel kuman *S.pullorum* ( S -11 ) dari Pusat Veterinaria Farma Surabaya. Kemudian dibuat suspensi kuman dengan PBS dengan standart kekeruhan Mac Farland 3. Setelah homogen dilanjutkan dengan membagi menjadi 6 kelompok ( bagian ) untuk perlakuan ultra sonikasi bertingkat dari 3 kali , 5 kali, 6 kali, 7 kali, 8 kali, dan 9 kali. Setelah sonikasi dilakukan pengukuran kadar protein dengan analisa spektrofotometer dengan reagen standart Sigma ( BSA 4 % ) pada masing – masing bagian. Setelah diketahui kadar protein masing – masing tingkat sonikasi dilanjutkan dengan pengukuran uji antigenitas dengan metode Elisa pada pengenceran antibodi kelinci 1 : 1000, masing – masing dengan 4 ulangan dan kemudian dibaca dengan alat Elisa reader sehingga diperoleh data nilai OD dari sampel maupun kontrol negatif.

Data hasil peneraan dari Elisa reader dicatat dan dilakukan tabulasi untuk masing – masing bagian ( kelompok ) serta kontrol negatif. Hasil data ini kemudian dilakukan uji statistik dengan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap ( RAL ) dan untuk membandingkan masing – masing tingkat dengan Uji T. Hasilnya ternyata tidak ada perbedaan yang nyata antara perlakuan 3 – 5 – 6 – 7 – 8 dan 9 kali sonikasi terhadap daya antigeniknya.

Berdasarkan atas hasil penelitian dan analisisnya, dapat disimpulkan bahwa ternyata protein OMP kuman *S.pullorum* dapat diisolasi dan dengan perlakuan berbagai tingkat ultra sonikasi tidak berbeda nyata daya antigeniknya

Melihat atas hasil dan kesimpulan serta kejadian penyakit pullorum dilapangan, maka dapat disarankan untuk perlunya dilakukan penelitian tentang perlakuan lebih lanjut terhadap protein OMP misalnya pengukuran berat molekul maupun sifat atau daya imunogeniknya sehingga kemungkinan dibuat vaksin secara sub unit dari kuman *S.pullorum* sebagai bahan dasarnya.

(L.P. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. No.Kontrak :  
589/ JO3.2/PG/2001., 13 Juni 2001 )

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Permasalahan

Penyakit pullorum atau Penyakit Berak Kapur ( Baccillary White Diarrhea ) adalah penyakit bakterial yang disebabkan oleh kuman *S.pullorum*, menyerang bangsa unggas terutama ayam. Penyakit ini bersifat akut dan berakibat fatal pada anak ayam umur 1 – 7 hari. Pada ayam dewasa penyakitnya bersifat kronis, kadang – kadang tanpa menimbulkan gejala klinis ( sub klinis ) dan yang sembuh dari penyakitnya dapat menjadi karier ( pembawa ), sehingga kuman dapat ditularkan melalui ovarium ( trans ovarial ).

Hofstad ( 1984 ) dan Akoso ( 1993 ) menyatakan bahwa penularan penyakit pullorum selain secara vertikal dari induk langsung ke anak ( trans ovarial ), juga secara horizontal dengan sesama hewan sekandang melalui mesin tetas, makanan – minuman dan secara aerogen ( melalui pernapasan ).

Di Indonesia penyakit berak kapur dikenal pertama kali pada tahun 1950 dan sampai sekarang masih belum terberantas, kerugian ekonomi sampai milliaran rupiah sering dialami baik oleh breeding farm maupun peternak ayam, demikian laporan Direktur Kesehatan Hewan ( 1988 ). Dilaporkan oleh Balai Penyidikan Penyakit Hewan ( Dit.Kes.Wan., 1996 ) bahwa kejadian kasus penyakit pullorum timbul didaerah Sumatra utara ( Deli Serdang ), Riau, Lampung ( 57 ), Bengkulu ( 96 ), Sumatra Selatan, Jakarta ( 2 ), Kendal ( 16 ), Bantul ( 5 ), Tuban ( 64 ), Sulawesi Utara ( 1 ), Sulawesi Tengah ( 3 ), Sulawesi Selatan ( 92 ).



Upaya pengobatan terhadap penyakit pullorum dengan menggunakan obat antibiotika telah sering dilakukan, namun usaha ini masih belum memberikan hasil yang memuaskan, sedangkan yang dilakukan hanyalah usaha pengendalian penyakit dengan uji pullorum.

Pullorum test dengan metode Rapid Whole Blood Test ( RWBT ) atau Rapid Serum Test ( RST ) adalah upaya pengendalian penyakit pullorum untuk mencari reaktor positif sebagai deteksi dini. Tindakan ini merupakan upaya yang harus dilakukan sesuai dengan peraturan Direktur Jenderal Peternakan bagi Breeding Farm, apabila terdapat reaktor positif harus dilakukan pemusnahan. Selain itu perlu dilakukan higiene dan sanitasi yang baik pada kandang, pakan yang baik serta manajemen ternak yang baik ( Direktur Kesehatan Hewan, 1996 ).

Tindakan pencegahan penyakit pullorum dengan melakukan vaksinasi belum pernah dilakukan di Indonesia, karena vaksin pullorum belum ada. Handijatno ( 1990 ) melaporkan bahwa telah dicoba dilakukan vaksinasi pada ayam dengan menggunakan Bakteriin *S.pullorum* ( kuman di inaktifasi dengan cara pemanasan dan cara penambahan formalin 0,5 % ) ternyata memberikan hasil titer rendah dan daya protektifnya hanya 20% saja. Wiryosuwanto ( 1997 ) berpendapat bahwa sebaiknya tindakan pencegahan dan pemberantasan suatu penyakit pada hewan ternak hendaknya dilakukan sesuai dengan ketentuan yang berlaku, karena hal ini menyangkut aspek kebutuhan hidup manusia. Dengan demikian usaha pengendalian dan pencegahan penyakit pullorum di Indonesia sebenarnya juga harus mengikuti peraturan yang telah ditetapkan oleh pemerintah. Percobaan Handijatno ( 1990 ) adalah merupakan langkah pengujian awal bakteriin *S.pullorum* sesuai dengan pendapat Hagan ( 1994 ) yang berpendapat bahwa karena kuman *S.pullorum* hanya memiliki O antigen saja, maka

kemungkinan dengan pemberian bakterin akan menimbulkan kekebalan. Namun hasilnya ternyata masih belum seperti yang diharapkan.

Berdasarkan atas uraian tersebut diatas, peneliti tertarik untuk melakukan upaya pengubahan ayam terhadap penyakit pullorum' dengan cara lain yaitu dengan melakukan isolasi protein membran luar ( Outer Membran Protein = OMP) kuman *S.pullorum* untuk diketahui sifat imunogenesitasnya. Sebagai langkah awal perlu diketahui lebih dulu daya tahan kuman pada bagian membran luar terhadap berbagai pengaruh tingkat sonikasi. Apabila telah diketahui sifat daya tahan kuman dan dapat di isolasi protein OMP kemudian dilakukan penelitian lebih lanjut dengan berbagai pengujian terhadap protein tersebut sampai kemungkinan dapat dipakai sebagai bahan dasar vaksin sub unit.

## 1.2 Rumusan Masalah

Telah diuraikan masalah penyakit pullorum sebagaimana tersebut diatas, maka dapat dilakukan rumusan masalah sebagai berikut:

- a. Dapatkah dilakukan pemecahan dinding luar kuman untuk mendapatkan protein OMP *S.pullorum* dengan cara ultra sonikasi?
- b. Apakah tingkat sonikasi berpengaruh terhadap sifat antigenitas protein OMP *S.pullorum*?



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Penyakit pullorum

Penyakit pullorum disebabkan oleh kuman *Salmonella pullorum*, menyerang bangsa unggas terutama pada ayam ( Anonimus, 1994 ). Kuman berbentuk batang, bersifat Gram negatif, tidak memiliki spora dan flagella, tidak berkapsul dan tumbuh secara optimum pada suhu 37°C ( Anonimus, 1981 dan Ay Ling, 1998 ). Kuman *S.pullorum* hanya memiliki somatik antigen ( O antigen ) saja dan pada uji biokimiawi membentuk dihidrogen sulfida ( uji Triple Sugar Iron Agar ), memfermentasi glukosa – sukrosa – mannososa dan tidak memecah urea, demikian pendapat Whiteman ( 1997 ) dan Hofstad ( 1984 ).

Isolasi kuman *S.pullorum* membutuhkan media selektif yaitu media Salmonella Shigella Agar ( SSA ) dan pertumbuhan pada media ini menunjukkan koloni yang halus, bulat dan tepi rata, tidak berwarna ( colorless ) dan tembus cahaya ( transparan ), demikian pendapat Hitchner ( 1980 ) dan Jackson ( 1981). Sedangkan pada media Sulfid Indol Motility ( SIM ) berupa garis putih pada bekas tusukan ( sifat non motil ) dan terjadi pembentukan gas dihidrogen sulfida dan uji indol hasilnya negatif, untuk pengujian ini memerlukan suasana aerob atau fakultatif anaerob ( Hagan, 1984. dan Akoso, 1993).

Penyakit pullorum atau dikenal pula dengan nama Penyakit Berak Kapur ( Baccillary White Diarrhea ) di Indonesia mulai dikenal pada tahun 1950 adalah merupakan penyakit menular yang ditandai adanya berak berwarna putih seperti kapur, dengan penularan secara horisontal dan vertikal ( trans ovarial ), demikian

pendapat Hostad ( 1984 ).

Unggas yang terserang penyakit pullorum, pada anak ayam umur sampai dengan 7 hari bersifat akut dan dapat berakibat fatal dengan angka kematian sampai 90%. Gejala klinis penyakitnya tidak nampak jelas, anak ayam bergerombol, lemah dan pada kotorannya berwarna putih seperti pasta. Sedangkan pada ayam dewasa bersifat kronis dan menunjukkan gejala gangguan produksi telur, daya tetas menurun dan kotorannya berwarna putih ada kecoklatannya ( Anonimus, 1981., dan Hofstad, 1984 ).

## 2.2 Diagnosis Penyakit Pullorum

Diagnosa terhadap penyakit pullorum dapat dilakukan dengan melihat gejala klinisnya, perubahan patologi anatomi dan pemeriksaan laboratorium dari bahan hewan tersangka . Pemeriksaan laboratorium untuk peneguhan diagnosa dilakukan sebagai upaya isolasi dan identifikasi kuman *S.pullorum*. Selain itu dapat dilakukan uji serologis dengan cara aglutinasi cepat , baik dengan Rapid Whole Blood Test ( RWBT ) atau dengan cara Rapid Serum Test ( RST ) untuk mengetahui reaktor, Anonimus ( 1994 ) dan Ratna ( 1994 ).

## 2.3 Tindakan Pencegahan dan Pemberantasan

Penyakit pullorum terkadang dapat dikacaukan dengan penyakit lain pada ayam seperti misalnya Fowl typhoid ( penyebabnya *S.gallinarum* ) atau penyakit Coccidiosis yang disebabkan oleh parasit koksidia ( Anonimus, 1981 ). Untuk itu upaya pengendalian dan pencegahan penyakit dilakukan dengan cara deteksi dini sesuai peraturan yang ditetapkan oleh pemerintah.

Oleh karena itu pada breeding farm ( pembibitan ayam ) pada umumnya tindakan deteksi dini dilakukan dengan metode Rapid Whole Blood Test ( RWBT ) pada ayam dewasa menjelang bertelur . Apabila dalam pengujian ini hasilnya positif ( reaktor positif ), maka dilanjutkan dengan pencegahan diagnosa laboratorium ( isolasi dan identifikasi kuman ). Sedangkan apabila hasil uji negatif, maka setelah 35 hari kemudian dilakukan pengujian ulang dan bila hasilnya tetap negatif dianggap bebas aman terhadap pullorum, dan telur serta anak ayam ( Day Old Chick = DOC ) bebas diedarkan. Perlakuan pengujian (Pullorum Test) dilakukan dua kali setahun. Semua hasil pengujian tersebut diwajibkan melaporkan kepada Dinas Peternakan setempat, sehingga apabila terjadi sesuatu dengan cepat melakukan tindakan sesuai dengan kewenangannya, Anonimus ( 1981 ).

Upaya pencegahan yang dilakukan terhadap penyakit pullorum selain melakukan deteksi dini juga melakukan desinfeksi kandang dengan cara fumigasi pada kandang dan mesin penetas yang menggunakan campuran antara  $KMnO_4$  dengan formalin serta sanitasi kandang yang baik, Anonimus ( 1981 ). Sedangkan pencegahan dengan vaksinasi tidak dilakukan karena tidak ada vaksin pullorum.

Tindakan pemberantasan dilakukan dengan cara pemusnahan reaktor positif. Hal ini perlu dilakukan karena pengobatan dengan antibiotika misalnya oksitetrasiklin, streptomisin atau dengan preparat sulfa hasilnya kurang memuaskan dan kemungkinan hewannya malah menjadi pembawa ( carrier ), Hofstad ( 1984 ).

## 2.4 Outer Membrane Protein ( OMP )

Wolfgang ( 1992 ) menyatakan bahwa pada umumnya dinding sel luar kuman gram negatif memiliki komposisi yaitu murein, lipoprotein, fosfolipid, protein dan lipopolisakarida. Jane ( 1992 ) dan Jawetz ( 1984 ) menambahkan bahwa dinding sel kuman Gram negatif juga mengandung 3 polimer yang terletak diluar lapisan peptidoglikan yaitu lipoprotein, selaput luar dan lipopolisakarida.

Jawetz ( 1984 ) menyatakan bahwa molekul lipoprotein terdiri dari lipid yang terikat pada selaput luar dan senyawa protein. Pada selaput luar ( Outer Membrane ) terdapat protein utama yang bergabung dengan lipoprotein dan terikat dengan peptidoglikan dan protein minor dalam selaput luar berfungsi sebagai pengangkut. Wolfgang ( 1992 ) menambahkan bahwa protein yang bergabung dengan lipoprotein dan terikat dengan peptidoglikan adalah protein outer membrane protein ( Protein OMP ) dan memiliki berat molekul 28 – 33 Kd.

## 2.5 Hipotesa Penelitian

Sehubungan dengan latar belakang masalah dan rumusan masalah, maka dapat ditarik suatu hipotesa sebagai berikut:

- Dinding luar kuman ( Outer Membrane ) *S.pullorum* dapat dipecah dengan cara ultra sonikasi dan dapat diisolasi protein membran luarnya ( protein OMP ).
- Protein OMP masih bersifat antigenik dengan berbagai tingkat sonikasi.

## BAB III

### TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Sebagaimana telah diketahui bersama bahwa upaya pencegahan penyakit pullorum pada ayam di Indonesia belum pernah dilakukan dengan cara vaksinasi. Hal ini karena belum pernah dibuat vaksin pullorum sedangkan yang dilakukan adalah tindakan pengendalian penyakit dengan cara pullorum test untuk mengetahui reaktor positif sebagai deteksi dini.

Oleh karena itu untuk pencegahan penyakit pullorum perlu dicari cara lain yaitu vaksinasi sub unit. Sebagai tahap awal adalah percobaan dengan penelitian terhadap kuman *S.pullorum* tentang sifat antigenitas dari protein membran luar ( protein OMP ), sehingga dalam penelitian ini mempunyai :

#### 3.1 Tujuan

- Mengetahui bahwa kuman *S.pullorum* dapat dipecah dinding luarnya dengan ultra sonikasi.
- Dapat dilakukan isolasi protein membran luarnya ( protein OMP ).
- Dengan berbagai tingkat sonikasi, protein OMP masih bersifat antigenik.

#### 3.2 Manfaat

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat bagi penelitian selanjutnya, yaitu pengujian dan penelitian lebih lanjut tentang protein OMP kuman *S.pullorum* sampai pemrosesan sebagai bahan dasar vaksin sub unit.

Selain itu hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai informasi ilmiah bagi khasanah ilmu pengetahuan bakteriologi veteriner,

terutama kuman *S.pullorum* yang kemungkinan dikembangkan secara bio molekuler.



## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Waktu Penelitian

Penelitian yang dilakukan ini secara lengkap memerlukan waktu selama 6 ( enam ) bulan, dimulai sejak bulan Juni sampai dengan Desember 2001. Penelitian dilakukan di laboratorium Bakteriologi – Mikologi dan Virologi – Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga serta laboratorium Tropical Disease Centre Universitas Airlangga Surabaya.

#### 4.2 Materi Penelitian

Kuman *S.pullorum*, diperoleh dari Pusat Verinaria Farma Surabaya dalam keadaan di kultur pada media stok ( kuman *S.pullorum* strain 11 murni ). Dalam penelitian ini kemudian diambil kumannya dan dibuat suspensi kuman dengan melarutkan kedalam Phosphat Buffer Saline ( PBS ) setara dengan standart Mc.Farland 3 .

Bakterin, diperoleh dari penelitian terdahulu yang merupakan suspensi kuman *S.pullorum* sebagai bahan vaksin in aktif untuk pembuatan antibodi poliklonal dari kelinci. Cara pembuatan bakterin ini dengan cara membuat suspensi kuman *S.pullorum* kemudian dipanaskan dengan suhu 80 C selama satu jam. Untuk aplikasinya dicampur dengan adsorber Al hidrogel dan pemberian secara intra muskuler.

Antibodi poliklonal, diperoleh dari penelitian terdahulu dengan cara penyuntikan bakterin *S.pullorum* dan suspensi kuman pada kelinci, kemudian

diambil serumnya yang telah mengandung antibodi dengan titer tinggi. Antibodi poliklonal ini dapat disimpan pada suhu beku untuk dipakai penelitian selanjutnya.

Buffer blocking, buffer washing, buffer stoping dan konjugat (alkali phosphatase anti rabbit), adalah merupakan bahan – bahan untuk uji antigenitas (uji Elisa) yang dalam penelitian ini sebagai uji in vitro dari protein OMP kuman *S.pullorum*.

Selain bahan – bahan tersebut perlu pula bahan pendukung misalnya aquades steril, kapas dan alat – alat pendukung penelitian seperti erlenmeyer, microplate, microtitre pippete, ultra sonikator, spectrophotometer, ultra centrifuge dan elisa reader.

### 4.3 Metode Penelitian

#### 4.3.1. Tahap persiapan

Pada tahap persiapan ini adalah merupakan tahapan untuk melakukan pengadaan alat dan bahan penelitian, sterilisasi alat dan persiapan pendukung penelitian. Kemudian pembuatan poliklonal antibodi dengan memakai hewan coba kelinci yang disuntik dengan bakterin pullorum agar diperoleh antibodi banyak, dipersiapkan untuk pelaksanaan uji antigenitas menggunakan cara elisa.

#### 4.3.2. Tahap penelitian

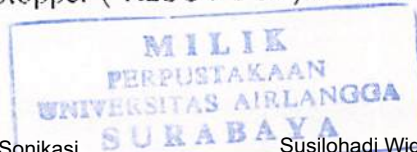
Pada tahapan ini diawali dengan pembuatan suspensi kuman pada kepekatan setara dengan standart MacFarland 3, caranya yaitu mengambil kuman dan di larutkan kedalam 300 ml PBS steril kemudian disetarakan kepekatannya pada standart Mac Farland 3. Kemudian suspensi kuman dibagi dalam 6 bagian

untuk ultra sonikasi 3 kali, 5 kali, 6 kali, 7 kali, 8 kali dan 9 kali.

Berikutnya masing – masing bagian dilakukan ultra sonikasi dengan alat ultra sonic homogenizer suhu 4°C / 3 menit jalan – 2 menit istirahat dan perlakuan sesuai dengan masing – masing tingkatan sonikasi. Selanjutnya masing – masing tingkatan ultra sonikasi dilakukan ultra sentrifugasi dengan alat Refrigerated centrifuge 40.000rpm suhu 4°C selama 20 menit dilakukan 3 kali. Pada yang ketiga kalinya pellet ditambah Triton X – 100 sebanyak 20 ml dan PBS 20 ml, kemudian dilakukan inkubasi pada 37°C selama 20 menit. Kemudian dilakukan ultra sentrifugasi lagi 2 kali, pellet yang diperoleh ditambah PBS 20 ml dan vortex 3 menit selanjutnya diperoleh protein OMP untuk pengujian selanjutnya.

Protein yang diperoleh masing – masing dilakukan pengukuran kadarnya menggunakan alat UV – Visible Spectrophotometer dengan standart kadar Bovine Serum Albumin ( BSA ) dan panjang gelombang 592 nm. Sehingga masing – masing tinkatan sonikasi diketahui kadar proteinnya per ml. Hasilnya digunakan untuk melakukan Elisa pada masing – masing tingkat sonikasi.

Setelah diketahui kadar proteinnya, dilakukan uji antigenesitas masing – masing tingkatan sonikasi dengan uji Elisa. Diawali dengan buffer coating ( buffer karbonat, PH 9,6 ) dan inkubasi 24 jam suhu 4°C, cuci 6 kali dengan buffer washing ( Na Cl – Tween 20 , PH 8,6 ) kemudian blocking dengan memakai creamer 4% ( buffer blocking PBS – Tween 20 – Creamer 4 % pada PH 7,4 ) dan inkubasi pada 37°C selama 1 jam, setelah itu dicuci 6 kali. Pengenceran sampel ( protein OMP ) 1 : 1000 dan inkubasi 37°C selama 60 menit. Kemudian di cuci 6 kali lalu ditambah konjugat ( alkali fosfatase anti rabbit ) diamkan pada tempat gelap selama 5 menit. Masukkan pada Stopper ( H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N ) dan selanjutnya



dibaca pada Elisa reader pada Optical Density ( OD ) 492 nm.

#### 4.4 Pengujian Penelitian

Pengujian sifat antigenitas dari protein OMP kuman *S.pullorum* dengan cara Elisa dapat diketahui dari pembacaan hasil elisa reader. Hasil yang terlihat adalah perubahan warna yang terjadi dan dihitung nilai optical density ( OD ). Sesuai dengan ketentuan bahwa jika nilai OD sampel 1,5 – 2 kali kontrol negatif, maka berarti reaksi positif antara antigen -- antibodi.

#### 4.5 Pengolahan Data

Pembacaan dari elisa reader dicatat dan dilakukan tabulasi sehingga diperoleh data yang kemudian dilakukan analisa statistiks. Dalam penelitian ini masing – masing tingkat sonikasi dilakukan uji dengan 4 ulangan dan kontrol negatif 1 ulangan, maka analisa statistik dapat digunakan memakai Rancangan Acak Lengkap ( One Way – Analysis of Variance ).

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 5.1 Hasil Penelitian

Setelah dilakukan percobaan dalam penelitian tentang pengaruh berbagai tingkat ultra sonikasi terhadap antigenitas protein membran kuman *S.pullorum*, maka pengujian masing – masing tingkat sonikasi dengan cara elisa sebagai uji antigenitas in vitro diperoleh hasil sebagai berikut ini:

##### 5.1.1 Kadar protein

Pengukuran kadar protein dengan spektrofotometer menggunakan reagen standart Sigma ( Bovine Serum Albumin ) adalah 400 ug/ml, menghasilkan rekaman spektrum 592 nm Optical Density ( OD ). Dengan demikian pada sampel yang telah mengalami ultra sonikasi bertingkat 3 kali, 5 kali, 6 kali, 7 kali, 8 kali dan 9 kali pada spektrofotometer menghasilkan data sebagaimana tabel 1 berikut dibawah ini ( Lampiran ).

##### 5.1.2 Uji Antigenitas dengan Elisa

Setelah diketahui kadar protein OMP *S.pullorum* dengan cara analisa spektrofotometer, maka hasilnya digunakan untuk menentukan seberapa banyak yang diperlukan pada uji antigenitas dengan cara Elisa. Setelah dilakukan Elisa kemudian dibaca hasilnya dengan menggunakan Elisa Reader, diperoleh data sebagaimana tabel 2 dan tabel 3 berikut ini ( Lampiran ).

### 5.1.3 Analisa Data

Dari hasil pengujian dengan Elisa didapat data sebagaimana disajikan tersebut diatas, kemudian data tersebut dilakukan analisa statistik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap ( RAL ) sehingga diperoleh hasil berikut ini sebagaimana terdapat dalam lampiran:

Bahwa dari analisa data menunjukkan tidak ada perbedaan nyata antara perlakuan berbagai tingkat sonikasi, tetapi dengan LPS dan suspensi kuman terdapat perbedaan nyata. Untuk itu dapat dilakukan diskusi pada hasil dan pembahasan berikutnya.

Demikian hasil yang diperoleh dari pemrosesan suspensi kuman *S.pullorum* untuk mendapatkan protein OMP yang melalui cara perlakuan ultra sonikasi bertingkat. Sedangkan perlakuan uji antigenitas dengan Elisa dalam penyajian tabel 2 dan tabel 3 tersebut diatas dengan menambah Lipopolisakarida ( LPS ) dan Suspensi kuman *S.pullorum* hanyalah sebagai tambahan data saja.

## 5.2. Pembahasan Hasil

Telah kita ketahui bersama bahwa penyakit pullorum adalah penyakit yang berakibat fatal pada anak ayam dan bersifat karier ( pembawa ) apabila menyerang ayam dewasa. Adanya reaktor positif pullorum pada peternakan atau breeding farm setelah pullorum test, maka sesuai dengan peraturan Direktur Jenderal peternakan harus dilakukan pemusnahan dan tindakan polisi veteriner lainnya.

Pada penelitian ini adalah merupakan suatu upaya awal untuk membuat vaksin sub unit protein *S.pullorum*, karena sampai saat sekarang belum pernah dilakukan upaya pencegahan dengan cara vaksinasi. Tindakan peraturan



pemerintah dengan melakukan pullorum tes hanyalah merupakan deteksi dini untuk mencari reaktor positif pullorum saja.

Sebagai tindak lanjut langkah awal tersebut adalah dilakukan penelitian terhadap kuman *S.pullorum* untuk mengetahui bagian kuman yang bersifat antigenik. Bagian kuman *S.pullorum* yang bersifat antigenik adalah terdapat pada membran luar, sebagaimana Hagan ( 1984 ) dan Hofstad ( 1986 ) menyatakan bahwa kuman *S.pullorum* hanyalah memiliki O antigen saja yang terletak dibagian membran luar dan antigen tersebut tahan terhadap pemanasan, alkohol dan asam. Sedangkan pada bagian membran luar ( Outer Membrane ) menurut Wolfgang ( 1992 ) dan Jane ( 1992 ) selain mengandung Lipopolisakarida ( LPS ) juga murein, lipoprotein, fosfolipid dan protein, yang mana protein inilah perlu diteliti apakah bersifat antigenik.

Kadar protein yang terkandung didalam protein OMP *S.pullorum* pada pengukuran dengan spektrofotometer menunjukkan kandungan cukup besar dibanding dengan standart, hal ini merupakan bukti bahwa di dalam membran luar kuman telah berhasil dilakukan isolasi proteinnya ( protein OMP ). Hal ini berarti metode yang digunakan untuk melakukan isolasi oleh Matsujama ( 1984 ) dan dimodifikasi sendiri berdasarkan alat yang kita miliki dapat digunakan dengan benar. Modifikasi tersebut adalah terletak pada ultrasonikasi , menurut Matsujama memakai sonikasi 20 KHz -5 menit jalan , 5 menit istirahat , tetapi alat sonikasi di TDC Unair 22 KHz – 3 menit jalan,2 menit istirahat.

Pada uji antigenitas metode Elisa dengan pengenceran antibodi kelinci 1 : 100 hasilnya kurang tampak jelas. Tabel 2 menunjukkan bahwa OD antara sampel dengan kontrol negatif sama ( mendekati sama ). Padahal menurut Harlow ( 1988 ) menyatakan bahwa rasio perbandingan antara kontrol negatif

dengan sampel harus paling sedikit 1,5 – 2 kali kontrol negatif. Oleh karena itu kemudian dilakukan pengenceran antibodi kelinci 1 : 1000, sehingga pada tabel 3 jelas nampak perbedaannya. Pada perlakuan sonikasi 3 kali memberikan hasil 3 kali kontrol negatif, sedangkan dengan perlakuan sonikasi 5 kali sampai dengan 9 kali memberikan hasil 2 – 2,5 kali kontrol negatif. Apabila mengacu dari pendapat Harlow ( 1988 ), maka walaupun dilakukan sonikasi bertingkat ternyata masih didapat protein OMP yang masih memiliki daya antigenitas yang cukup baik. Untuk menguji pengaruhnya maka dilakukan penghitungan dengan analisa statistik .

Analisa statistik untuk mengetahui pengaruh berbagai tingkat sonikasi terhadap sifat antigenitas protein OMP, hasil pengolahan data menunjukkan bahwa antara sonikasi 3 kali – 5 kali – 6 kali – 7 kali- 8 kali dan 9 kali tidak menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap daya antigenitasnya. Hal ini dapat terjadi karena metode yang digunakan disini khusus untuk melakukan isolasi protein membran luar, sehingga walaupun sonikasi sampai 9 kali tetap yang terisolir adalah protein OMP saja dan memiliki sifat antigenitas yang sama. Hal ini sesuai dengan pendapat Westermcier ( 1997 ) bahwa isolasi protein OMP dengan sonikasi beberapa kali dapat dilakukan dengan hasil yang sama, maka dalam penelitian ini telah dapat membuktikan pendapat tersebut terhadap kuman *S.pullorum*.

Disisi lain perbedaan nyata dengan LPS dan suspensi kuman dengan perlakuan tingkat sonikasi, terutama dengan suspensi kuman hasilnya hampir sama dengan kontrol negatif. Ini dapat terjadi kemungkinan kurang kuatnya ikatan antara antibodi dengan antigen ( kuman ), sehingga terbukti adanya perubahan warna sebagai manifestasi ikatan tersebut tampak jelas dalam nilai OD.

Dibanding dengan protein OMP, jelas bahwa sifat antigeniknya lebih kuat sehingga mampu mengikat antibodi dan terbukti dengan nilai OD nya tinggi. Dengan demikian terbukti bahwa walaupun dengan berbagai tingkat sonikasi, protein OMP kuman *S.pullorum* bersifat antigenik yang kuat.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

Setelah dilakukan percobaan dalam penelitian tentang pengaruh berbagai tingkat ultra sonikasi terhadap antigenitas protein membran kuman *S.pullorum*, kemudian diperoleh hasil dan dilakukan analisa data dengan statistiks, maka dapat ditarik kesimpulan dan saran sebagai berikut.

#### 6.1 Kesimpulan

1. Dengan cara ultra sonikasi telah dapat dilakukan isolasi protein OMP kuman *S.pullorum*.
2. Ultrasonikasi bertingkat ( 3 kali sampai dengan 9 kali ) masih dapat diperoleh protein OMP yang bersifat antigenik sama ( 2 – 3 kali kontrol negatif ).

#### 6.2 Saran

Berdasarkan atas kesimpulan tersebut ternyata masalah kuman *S.pullorum* masih dapat dikembangkan, untuk itu dapat disarankan sebagai berikut :

1. Perlu diteliti lebih lanjut apakah sifat antigenik tersebut dapat pula bersifat imunogenik
2. Perlu diteliti berat molekul protein OMP tersebut yang bersifat antigenik, sehingga dapat diketahui sifat imunogeniknya dengan uji hewan coba (in vivo), misalnya langsung pada ayam.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus, 1981. Pedoman Pengendalian Penyakit Menular Jilid I. Cetakan Kedua. Dit.Kes.Wan. Direktorat Jenderal Peternakan. Departemen Pertanian. Jakarta.
- Anonimus. 1988. Peta Penyakit Hewan Di Indonesia. Departemen Pertanian . Direktorat Jenderal Peternakan. Direktur Kesehatan Hewan . Jakarta.
- Anonimus. 1993. Peta Penyakit Hewan Di Indonesia. Departemen Pertanian. Direktorat Jenderal Peternakan. Direktur Kesehatan Hewan. Jakarta.
- Anonimus. 1994.. The Merck Veterinary Manual. 9th. Ed. Merck and Co. Inc. Rahway. New Jersey. USA.
- Anonimus. 1996. Peta Penyakit Hewan Di Indonesia. Departemen Pertanian. Direktorat Jenderal Peternakan. Direktur Kesehatan Hewan. Jakarta.
- Ay Ling. 1998. Penentuan LD50 dan ID50 *S. pullorum* Pada Anak Ayam Petelur Yang Di Infeksi Secara Oral Dan Pengaruhnya Terhadap Gambaran Patologi Anatomi. Skripsi FKH – Universitas Airlangga. Surabaya.
- Didik Handijatno. 1990. Evaluasi Hasil Vaksinasi *Salmonella pullorum* Pada Ayam. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya.
- Hagens. W. And D.W. Brunners. 1994. Infectious Disease of Domestic Animals. 7th. Ed. Comstock Publishing Associated Cornell University Press. Ithaca. London.
- Harlow. Ed. And David L. 1988. Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. United State of America.
- Hofstad, M.S., B.W. Calnek., C.P. Helmbolt., W.M. Reid and Jonder. 1984. Disease of Poultry. 8th.Ed. The Iowa State University Press. Ames: Los Artos. California.
- Jackson, C. A.W. and G.C. Simmons, 1981. Standart Diagnostic Technique for Pullorum Disease. 1st.Ed. The Australia Bureau of Animal Health. Australia.
- Jawetz. E., Melnick, J.L. and Adelberg.E.A. 1984. Review of Medical Microbiology. 14.Ed.Lange Medical Publication. Los Altos. Chicago.
- Matsujama. S.I., Inokuchi K and Matshushita. S.1984. Promoter Exchange Between OMP F and OMP C for Osmoregulated Major Membrane Proteins of E.coli K-12. J.Bacteriol. 156: 1041 -1047.

- Ratna Farida. 1994. Pengaruh Inokulasi *S. pullorum* pada T.A.B. Terhadap Fertilitasnya. Skripsi Fakultas Kedokteran Hewan – Universitas Airlangga.
- Steel.R.G.D., and G.H. Torrie. 1980. Principles and Procedures of Statistic a Biometrical. 2nd.Ed. Mc Graw Hill Book Company.
- Tizard. 1988. Pengantar Immunologi Veteriner. Edisi ke 2. Airlangga University Press. Surabaya.
- Westermeier.R. 1997. Electrophoresis in Practice. A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations. Second Edition. . VCH-A Willey Company. Federal Republic of Germany.
- Whitemann, C.E. and A.A. Bickford. 1997. Avian Disease Manual. 3rd. Ed. American Association of Avian Pathologist. Kendall/Hunt Publishing Company. Iowa.
- Wiryo Suwanto. S D. 1997. Pembangunan Peternakan Repelita VII , Tujuan Aspek Filosofi, Kebijakan Umum Dan Operasional, Pola Dan Model Pembangunannya. Makalah Seminar Kajian Kebijakan Pembangunan Peternakan. Maret 1997. Cisarua – Bogor.
- Wolfgang, K.J, Willet.H.P. , Amos D.D., Willfeet.C.M. 1992. Zinsser Microbiology. 19th.Ed. Prentice Hall International Inc. Appleton and Lange. USA.



## LAMPIRAN I

Tabel 1. Kadar protein OMP *S.pullorum* hasil sonikasi bertingkat dengan analisa spektrofotometer.

No.	Sampel	Analisa spektrum	Kadar Protein ( ug/ml )
1	Standart	0,271	400
2	3 X	1,174	1.732,8
3	5 X	1,144	1.688,6
4	6 X	1,318	1.945,4
5	7 X	1,397	2.061,9
6	8 X	1,337	1.973,4
7	9 X	1,394	2.057,6

Tabel 2. Nilai OD Elisa indirect dari antigen protein OMP *S.pullorum* pada pengenceran antibodi kelinci 1 : 100.

Perlakuan	Ulangan					Kontrol	
	1	2	3	4	X	Negatif	PBS
3 X	1,782	1,496	1,498	1,505	1,495	1,502	0,052
5 X	1,522	1,527	1,526	1,538	1,528	1,540	0,012
6 X	1,496	1,525	1,506	1,507	1,508	1,521	0,043
7 X	1,472	1,489	1,489	1,490	1,480	1,504	0,029
8 X	1,545	1,552	1,543	1,549	1,547	1,561	0,025
9 X	1,515	1,520	1,533	1,533	1,524	1,542	0,012
LPS	1,527	1,535	1,541	1,541	1,536	1,551	0,034
Susp.S.p.	1,522	1,522	1,525	1,529	1,524	1,538	--

Tabel 3. Nilai OD Elisa indirect dari antigen protein OMP *S.pullorum* pada pengenceran antibodi kelinci 1 : 1000.

Perlakuan	Ulangan					Kontrol	
	1	2	3	4	X	Negatif	PBS
3 X	1,008	1,091	1,129	1,182	1,102	0,357	0,052
5 X	0,869	1,058	1,171	1,165	1,065	0,443	0,012
6 X	1,071	0,974	1,155	1,109	1,077	0,430	0,043
7 X	1,088	1,127	1,109	1,105	1,107	0,549	0,029
8 X	1,089	1,151	1,142	1,007	1,097	0,548	0,025
9 X	1,113	1,120	1,145	1,188	1,142	0,495	0,012
LPS	0,624	0,586	0,848	0,652	0,677	0,247	0,034
Susp.S.p.	0,491	0,486	0,520	0,528	0,506	0,371	--

LAMPIRAN 2

Lampiran Analisa Data :

One – Way Analysis of Variance

Analysis of Variance for data

Source	DF	SS	MS	F	P
Resp	7	1,61304	0,23043	36,12	0,000
Error	24	0,15312	0,00638		
Total	31	1,76616			

Individual 95% CIs For Mean  
Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	-----!-----!-----!-----!-----	
1	4	1,1025	0,0732		(---#---)
2	4	1,0657	0,1411		(---#---)
3	4	1,0772	0,0769		(---#---)
4	4	1,1073	0,0160		(---#---)
5	4	1,0972	0,0661		(---#---)
6	4	1,1415	0,0339		(---#---)
7	4	0,6775	0,1168	(---#---)	
8	4	0,5062	0,0209	(---#---)	
				-----!-----!-----!-----!-----	
Pooled StDev= 0,0799				0,50	0,75 1,00 1,25

Two Sample T-test and Confidence Interval

Two sample T for rat

resp	N	Mean	StDev	SE Mean
1	8	0,972	0,240	0,085
2	8	0,321	0,194	0,069

95% CI for mu ( 1 ) – mu ( 2 ) : ( 0,415 , 0,887 )

T –test mu ( 1 ) = mu ( 2 ) ( vs not = ) : T = -5,97 P = 0,0000 DF = 13

Two Sample T-test and Confidence Interval

Two sample T for rat

Resp	N	Mean	StDev	SE Mean
1	6	1,0986	0,0264	0,011
2	6	0,324	0,226	0,092

95% CI for mu ( 1 ) – mu ( 2 ) : ( 0,535 , 1,103 )

T –test mu ( 1 ) = mu ( 2 ) ( vs not = ) : T = 8,32 P = 0,0004 DF = 5



PAMERAN

- 1 APR 2003

